

VRSTE RODOVA *Pectobacterium* I *Dickeya* – PROUZROKOVAČI CRNE TRULEŽI PRIZEMNOG DELA STABLA I VLAŽNE TRULEŽI KRTOLA KROMPIRA

Marta Loc¹, Gordana Petrović², Maja Ignjatov², Dragana Budakov¹,
Mladen Petreš¹, Vera Stojšin¹, Mila Grahovac¹

¹Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet

²Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

E-mail: marta.loc@polj.uns.ac.rs

Izvod

Proizvodnja krompira u svetu značajno je ugrožena delovanjem fitopatogenih bakterija, te godišnji gubici prinosa poprimaju sve veće razmere. Među deset ekonomski najznačajnijih fitopatogenih bakterija koje smanjuju prinos i kvalitet poljoprivrednih kultura ističu se vrste rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* – prouzrokovaci crne truleži prizemnog dela stabla “crna noga” i vlažne truleži krtola krompira. Najznačajniji izvor infekcije su zaražene semenske krtole, te bakterije ovim putem lako dospevaju u nova područja. Identifikacija bakterija rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* se do nedavno zasnivala na proučavanju morfoloških odlika bakterijskih kolonija uz upotunjavanje testovima patogenosti i biohemijskim analizama. Zbog heterogenosti populacije patogena precizna identifikacija prouzrokovaca vlažne truleži je dodatno otežana. S obzirom na potrebe za brzom i pouzdanom identifikacijom, u primenu su uvedene serološke i molekularne metode. Molekularne tehnike identifikacije, zbog svoje visoke specifičnosti, brzine izvođenja, pouzdanosti i ponovljivosti danas zauzimaju vodeće mesto u identifikaciji patogena. U radu su prikazane vrste rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* koje se javljaju na krompiru, sa posebnim osvrtom na molekularne tehnike identifikacije.

Ključne reči: bakterioze krompira, vlažna trulež, *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp., identifikacija

UVOD

Krompir je jedna od najznačajnijih gajenih biljnih vrsta u svetu. Po agrotehničkom, biološkom, ekološkom, ekonomskom značaju i rasprostranjenosti zauzima četvrto mesto, nakon pirinča, kukuruza i pšenice. Visoke je nutritivne vrednosti i sadržaja skroba, te je izuzetno zastupljen u ishrani ljudi i domaćih životinja. Prime nu nalazi i u mnogim granama industrije, proizvodnji skroba, alkohola, biogoriva i biorazgradive plastike. Proizvodnja krompira je široko zastupljena, kako zbog visokog privrednog značaja tako i oskudnih zahteva za gajenje. Godišnja proizvodnja krompira u svetu se procenjenjuje na oko 388 miliona tona (FAO, 2019). Republika Srbija raspolaže povoljnim uslovima za proizvodnju krompira, kako u glavnim po-

ljoprivredno-proizvodnim područjima, tako i u brdsko-planinskom regionu. Krompir se na teritoriji R. Srbije gaji na 38.472 ha uz ostvareni prinos od 589.241 tona krtola (FAO, 2019). Proizvodnja krompira u svetu a i R. Srbiji poslednjih godina biva značajno ugožena delovanjem fitopatogenih mikroorganizama, u prvom redu fitopatogenih bakterija, te godišnji gubici prinosa poprimaju sve veće razmere.

Najznačajnija bakterijska oboljenja krompira koja se redovno javljaju i značajno ugrožavaju proizvodnju krompira u Evropi su mrka trulež krtola krompira i bakterijsko uvenuće krompira i paradajza – prouzrokovatelj *Ralstonia solanacearum* (raniji naziv: *Pseudomonas solanacearum*); prstenasta trulež krtola – prouzrokovatelj *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (raniji naziv: *Corynebacterium sepedonicum*). Ove vrste nalaze se na EPPO A2 karantinskoj listi (European and Mediterranean Plant Protection Organization), kao i na IA deo I karantinskoj listi štetnih organizama Republike Srbije i nad ovim patogenima na krompiru se sprovodi poseban nadzor.

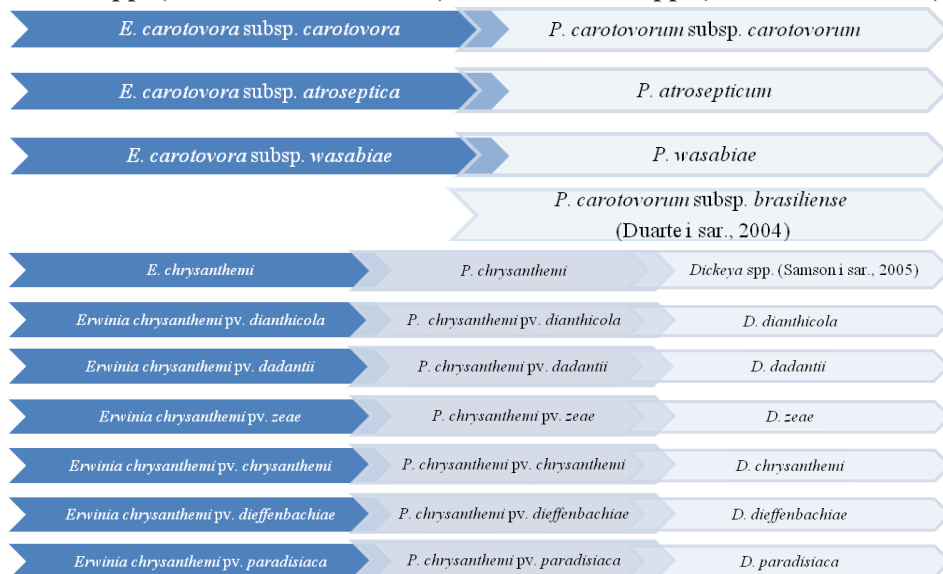
Pored navedenih patogena, kao ograničavajući faktor u proizvodnji krompira izdvajaju se i prouzrokovatelji obične krastavosti krtola – *Streptomyces scabiei*, *S. acidiscabiei*, *S. turgidiscabiei*, a među deset ekonomski najznačajnijih fitopatogenih bakterija koje ograničavaju prinos i kvalitet poljoprivrednih kultura se ističu vrste rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* -prouzrokovatelji crne truleži prizemnog dela stabla “crna noga” i vlažne truleži krtola: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (raniji naziv *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) (Pca), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (raniji naziv *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) (Pcc), *Pectobacterium wasabiae* (raniji naziv *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*) (Pw), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb), *Dickeya chrysanthemi* (raniji naziv *Pectobacterium chrysanthemi*, *Erwinia chrysanthemi*), *D. dianthicola* (raniji naziv *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*), *D. dadantii*, *D. solani* (Mansfield i sar., 2012). Kako su vrste rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* prethodno pripadale rodu *Erwinia*, promene u sistemu taksonomije i nomenklature vrlo često dovode do zabune u literaturi. Kratak prikaz promena u taksonomiji prouzrokovatelja vlažne truleži i crne noge krompira koji pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* je dat u Šemi 1.

Rasprostranjenost i ekonomski značaj. Od svih vrsta roda *Pectobacterium*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* je patogen koji ima najširi areal rasprostiranja, kao i najširi spektar domaćina, parazitira biljke koje su botanički veoma udaljene. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* je genetički i fenotipski veoma homogen patogen prisutan u umerenom klimatskom području i ograničen prvenstveno na krompir. *Pectobacterium wasabiae* je poreklom iz Japana, detektovan na teritoriji Novog Zelanda, Južne Afrike, Kanade i nekoliko evropskih zemalja, gde prouzrokuje značajne ekonomske gubitke u proizvodnji krompira. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* je veoma štetan patogen iz

tropskog i suptropskog klimatskog regiona, odakle se poslednjih godina sporadično ustalio i na tlu evropskog kontinenta. Pcb je prvi put izolovan iz zaraženog krompira u Brazilu (Duarte i sar., 2004). U Evropi je prisustvo ovog patogena potvrđeno 2012. godine u Belgiji i Holandiji (Nunes Leite i sar., 2015), u Poljskoj i Švajcarskoj 2015. godine (Waleron i sar., 2015; De Werra i sar., 2015), u Kini, Rusiji i Srbiji 2018. godine (Zhao i sar., 2018; Voronina i sar., 2018; Popović i sar., 2018). Vrste roda *Dickeya* poznati su patogeni prvenstveno ukrasnog bilja iz rodova *Chrysanthemum* i *Dianthus*, ali i kukuruza, krompira i paradajza (Burkholder i sar., 1953; Samson i sar., 2005). Prvi izveštaj o *Dickeya* vrstama na krompiru u Evropi, tačnije u Holandiji, datira iz sedamdesetih godina prošlog veka (Golanowska i Lojkowska, 2016). U većini evropskih zemalja dalja pojava ovog patogena je bila sporadična. Ranih devedesetih godina prošlog veka *E. chrysanthemi* je prepoznata kao najučestaliji patogen na semenskom krompiru u Švajcarskoj, odmah zatim i Pca (Cazelles i Schwarzel, 1992). Međutim, u poslednje vreme se beleži sve intenzivnije obolevanje krompira u Švedskoj (Persson, 1991), Španiji (Palacio-Bielsa i sar., 2006), Finskoj (Laurila i sar., 2006), Francuskoj (He'lias, 2006), Holandiji (van der Wolf i sar., 2009), Poljskoj (Sławiak i sar., 2009a), Engleskoj (Parkinson i sar., 2009), Škotskoj (Cahill i sar., 2010) i Izraelu (Tsror i sar., 2009), a ona se pripisuju upravo prouzrokovateljima iz roda *Dickeya*. Od 2004. godine za većinu izolata dobijenih iz zaraženog krompira u Evropi je potvrđeno da je u pitanju prouzrokovatelj *D. dianthicola* (Parkinson i sar., 2009; Sławiak i sar., 2009b).

Šema 1. Promene u taksonomiji prouzrokovaca vlažne trleži i crne noge krompira (Czajkowski i sar., 2014)

***Erwinia* spp. (Burkholder i sar., 1957) *Pectobacterium* spp. (Gardan i sar., 2003)**

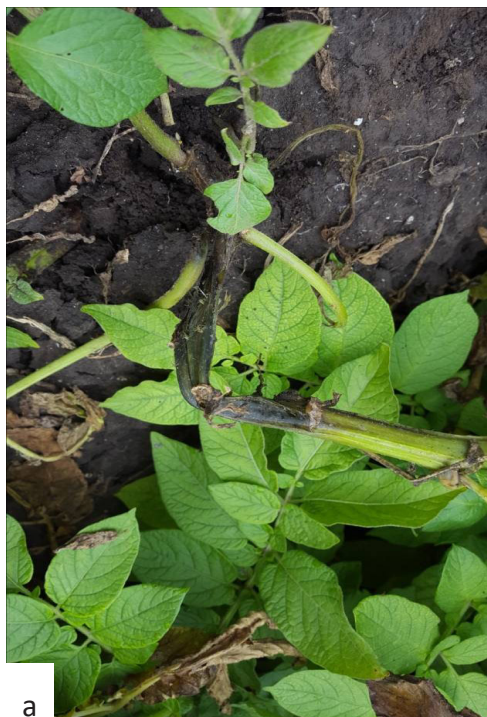


Na krompiru u Srbiji su dominantne vrste Pca i Pcc. Poslednjih godina sve češće se navodi pojava Pcb na različitim biljnim vrstama i ukazuje na ovu vrstu kao na novoidentifikovanog člana porodice Enterobacteriaceae, prouzrokovaca vlažne truleži na krompiru. U 2018. godini ove bakterije su prvi put detektovane na krompiru na lokalitetima Obrovac, Feketić i Kula (Popović i sar., 2018, Grahovac i sar., 2019), i to na veoma zastupljenoj sorti Lady Claire.

Osobine patogena, biologija i simptomi oboljenja. Prouzrokovaci vlažne truleži i crne noge krompira su gram-negativni, asporogeni, pokretni fakultativni anaerobi, peritrihog rasporeda flagela. Ove vrste ne stvaraju oksidazu, formiraju katalazu, redukuju nitrate, proizvode β -galaktozidazu, H_2S iz natrijumsulfata i kiselinu iz arabinoze, riboze, ramnoze, fruktoze, galaktoze, manoze, celobioze, glicerola, manitola, sorbitola, eskulina i salicina. Ove bakterije ne proizvode ureazu niti kiselinu iz adonitola. Odlikuje ih proizvodnja enzima koji dovode do degradacije ćelijskog zida i razmekšavanja biljnog tkiva na kom se hrane (Czajkowski, 2006). Najznačajniji izvor infekcije su zaražene semenske krtola, tako da bakterije ovim putem imaju mogućnost dospevanja u nova područja. Pored latentno zaraženih krtola, izvor inokuluma su i zaraženi biljni ostaci i alternativni domaćini na kojima patogen ima sposobnost održavanja. Zaraza krtola nastaje tokom vegetacije, preko stolona, dodirom zdravih i zaraženih krtola, dodirom krtola sa obolelim nadzemnim delom biljke, spiranjem bakterija sa nadzemnog dela biljke padavinama i njihovim oticanjem zemljišnom vodom (Czajkowski, 2006). Patogen zadržava vitalnost u zemljištu u trajanju od jedne nedelje do šest meseci, zavisno od temperature, vlažnosti i pH vrednosti zemljišta. Životni vek patogena može biti duži u slučaju održavanja u biljnom materijalu i na korovskim biljkama (Czajkowski i sar., 2011). Širenje je moguće i alatom, mehanizacijom, vodom za zalivanje, insektima. Mesto prodora patogena su lenticle, mehaničke povrede nastale u procesu vađenja krtola, naročito ukoliko je vađenje obavljeno u fazi kada krtola nisu dovoljno sazrele, ili je već prethodno nastalo oštećenje delovanjem nekog drugog patogena. Jačem intenzitetu oboljenja doprinose topli i vlažni vremenski uslovi, gusta cima, uslovi navodnjavanja, kao i prekomerno đubrenje azotom.

Osnovna karakteristika navedenih prouzrokovaca vlažne truleži i crne noge je razlaganje pektina kao osnovnog sastojka srednje ćelijske lamele, što dovodi do dezorganizacije biljnih ćelija. Parazitirana tkiva se preobražavaju u bezobličnu vodnjikavu masu kašaste konzistencije (Slika 1b). Zbog procesa razmekšavanja i truleži prizemnog dela stabla, razvoj zaražene biljke je usporen, a lišće počinje da žuti i vene. Zahvaćeni deo stabla tamni, dobija crnu boju, odakle i naziv "crna noga" (Slika 1a). Stablo se zbog gubitka čvrstoće savija, a nakon toga i izumire.

Proces truljenja krtola se nastavlja i u uslovima skladištenja. Iz razmekšalog tkiva krtola ističe tečnost, što dodatno pogoduje zarazi susednih uskladištenih krtola, te se propadanje brzo manifestuje uz širenje neprijatnog mirisa (Slika 2).



Slika 1. Simptom truleži prizemnog dela stabla krompira – “crna noga” prouzrokovan bakterijom *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (Loc, 2019)



Slika 2. Proces truljenja krtola u uslovima skladištenja prouzrokovano delovanjem vrsta roda *Pectobacterium* <https://www.agric.wa.gov.au/potatoes/soft-rot-diseases-potatoes?nopaging=1>

Identifikacija patogena. Godinama unazad, identifikacija bakterija roda *Pectobacterium* i *Dickeya* se zasnivala prvenstveno na proučavanju morfoloških odlika bakterijskih kolonija izolovanih na standardnu bakteriološku hranljivu podlogu – mesopeptonsku podlogu (MPA) ili na selektivnu podlogu – podloga sa kristal violet i natrijum polipektatom (CVP), koje su upotpunjavane daljim testovima patogenosti i biohemijskim analizama (Czajkowski i sar., 2014). Diferencijalni biohemijsko-fiziološki testovi za kompleks prouzrokovaca vlažne truleži krompira iz rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Biohemijsko-fiziološki testovi za diferencijaciju prouzrokovaca vlažne truleži iz rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* (Pcc, Pca, Pw, Pcb i *Dickeya* spp.) (Baghaee-Ravari i sar., 2011)

Test	Pcc	Pca	Pw	Pcb	<i>Dickeya</i> spp.
Formiranje udubljenja na CPV podlozi pri 28°C u trajanju 24h	+	+	+	+	+
Razvoj na hranljivom agaru pri 37°C	+	-	+/-	+	+
Porast u 5% NaCl	+	+	+/-	+	-
Osetljivost na eritromicin	-	-	-	-	+
Stvaranje redukujućih produkata iz saharoze	-	+	-	-	-
Stvaranje indola	-	-	-	-	+
Stvaranje fosfataze	-	-	-	-	+
Stvaranje kiseline iz laktoze	+	+	-	+	+
Stvaranje kiseline iz maltoze	-	+	-	+	-
Stvaranje kiseline iz α - metil glukozida	-	+	-	+	-
Stvaranje kiseline iz trehaloze	+	+	+	+	-
Stvaranje kiseline iz sorbitola	-	-	-	-	-
Korišćenje malonata	-	-	-	-	+

+ pozitivna reakcija, – negativna reakcija, +/- varijabilna reakcija

Kompleksnost izvođenja biohemijско-fizioloških testova i utrošak vremena i hemikalija nametnuo je potrebu za iznalaženjem i razvojem novih metoda u identifikaciji fitopatogenih bakterija. S obzirom na potrebu za brzom i pouzdanom identifikacijom biljnih patogena, serološke metode su našle veliku primenu, a među najzastupljenijim su: metod aglutinacije (*Express agglutination test*), ELISA test (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) i IF test (*Immunofluorescence test*). Serološki testovi uz korišćenje monoklonalnih i poliklonalnih antitela omogućavaju uspešnu identifikaciju na nivou vrste *P. carotovorum* (van der Wolf i sar., 1996b). Međutim, identifikacija sojeva bakterija do nivoa podvrste pokazala se problematičnom, zbog postojanja različitih seroloških grupa.

Razvojem molekularnih tehnika, identifikacija patogena je upotpunjena i olakšana, te zbog svoje visoke specifičnosti, brzine izvođenja, pouzdanosti i ponovljivosti molekularne metode danas zauzimaju vodeće mesto, a biohemijско-fiziološki testovi se koriste u cilju potvrde rezultata dobijenih serološkim i molekularnim metodama. Imajući u vidu heterogenost populacije patogena, molekularna karakterizacija je najpouzdanija i najpreciznija, te je postala vodeća u diferencijaciji prouzrokovaca vlažne truleži i crne noge krompira. Svoju primenu nalazi u identifikaciji sojeva bakterija do nivoa vrste i podvrste, kao i proučavanjima genetičkog diverziteta usko povezanih vrsta. Ključna prednost ovih metoda je u tome što su nezavisne od spoljašnjih uslova, starosti i fiziološkog stanja ciljanog patogena (Cuppels i sar., 2006). Osim toga, moguće je detektovati patogene prisutne u biljnom materijalu i u veoma niskim koncentracijama, kako u simptomatičnim, tako i u asimptomatičnim uzorcima. Metoda lančane reakcije polimeraze (Polymerase chain reaction – PCR), kao najčešće upotrebljavana molekularna metoda, podrazumeva umnožavanje specifičnog regiona prisutnog u bakterijskom genomu. Za identifikaciju bakterija kao polazni materijal koristi bakterijska DNK izolovana iz čiste kulture bakterija ili iz biljnog tkiva, odnosno 16S rRNK gen koji se umožava u PCR reakciji. Genska sekvenca ribozomalne DNK nije podložna promenama tokom evolucije, njena funkcija se nije menjala tokom vremena, stoga njena analiza predstavlja relativno jednostavan, a pouzdan put u filogenetskim proučavanjima različitih vrsta bakterija i najčešće je korišćen genetički marker u taksonomiji, odnosno filogenetskoj analizi bakterija. Za dobijanje parcijalne ili skoro cele sekvence gena za 16S rRNK koriste se univerzalni bakterijski prajmeri, a sekvence se potom analiziraju BLAST alatima. Razvojem biotehnologije u zaštiti bilja, u novijim istraživanjima dizajnirani su specifični parovi prajmera koji amplifikuju proizvode različitih veličina baznih parova za svaku od navedenih vrsta i podvrsta bakterija ponaosob, što olakšava i ubrzava detekciju i diferencijaciju vrsta roda *Pectobacterium* i *Dickeya*. Dostupne molekularne metode za detekciju i identifikaciju *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. su date u Tabeli 2.

Tabela 2. Pregled postojećih PCR metoda za identifikaciju vrsta roda *Pectobacterium* i *Dickeya*

Vrsta	PCR metoda	Prajmeri (5'-3') (naziv, sekvenca)	Veličina PCR produkta (bp)	Literatura
<i>Dickeya</i> spp. i <i>Pectobacterium</i> spp.	Konvencionalna	SR3F GGTGCAAGCGTTAATCGGAATG	119	Toth i sar. (1999b)
		SR1cR AGACTCTAGCCTGTCAGTTTT		
	Konvencionalna RPLF	G1 GAAGTCGTAACAAGG		Toth i sar. (2001)
		L1 CAAGGCATCCACCGT		
<i>Dickeya</i> spp.	Konvencionalna RPLF	ADE1 GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT	420	Nassar i sar. (1996)
		ADE2 CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC		
	Konvencionalna RPLF	peIZ-1-F ATGAAACATACCCTTCTGTTTGC	1263	Lee i sar. (2006)
		peIZ-1-R TTATTCCAGATCTTTGGCCAT		
	Konvencionalna	5A GCGGTTGTTACACAGGTGTTTT	-	Chao i sar. (2006)
		5B ATGCACGCTACCTGGAAGTAT		
	Real time PCR	Df AGAGTCAAAAGCGTCTTG	133	Laurila i sar. (2010)
		Dr TTTCACCCACCGTCAGTC		
	Real time PCR, TaqMan	ECHf GAGTCAAAAGCGTCTTGCGAA	-	Pritchard i sar. (2012)
		ECHr CCCTGTTACCGCCGTGAA		
		Probe ECH		
		CTGACAAGTGATGTCCCCTTCGTCTAGAGG		
<i>Dickeya dianthicola</i>	Real time PCR, TaqMan	DIA-Af GGCCGCCTGAATACTACATT	-	Pritchard i sar. (2012)
		DIA-Ar TGGTATCTCTACGCCCATCA		
		Probe ATTAACGGCGTCAACCCGGC		
		DIA-Cf CCAACGATTAGTCGGATCT		
		DIA-Cr TAGTTGGTGCCAGGTTGGTA		
		Probe DIA-C TCGACGTATGGGACGGTCGC		
		SOL-Cf GCCTACACCATCAGGGCTAT		
		SOL-Cr ACACTACAGCGCGCATAAAC		
<i>Dickeya solani</i>	Real time PCR, TaqMan	Probe Sol-C CCAGGCCGTGCTCGAAATCC	-	Pritchard i sar. (2012)
		SOL-Df GCCTACACCATCAGGGCTAT		
		SOL-Dr CACTACAGCGCGCATAACT		
		Probe SOL-D CCAGGCCGTGCTCGAAATCC		
	Real time PCR, TaqMan	dsf GCGAACTTCAACGGTAAA	112	van Vaerenbergh i sar. (2012)
		dsr CAGAGCTACCAACAGAGA		
		Probe CTCTGCTGGACGGTTC		

<i>Pectobacterium</i> spp.	Konvencionalna	Y1 TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT	434	Darrassee i sar. (1994)
		Y2 CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT		
		Y45 TCACCGGACGCCGAAGTGTGGCGT	439	Fréchon <i>i sar.</i> (1998)
		Y46 TCGCCAACGTTTCAGCAGAACAAAGT		
Pca	Konvencionalna	Eca1 CGGCATCATAAAAAACACG	690	de Boer i Ward (1995)
		Eca2 GCACACTTCATCCAGCGA		
	Lamp	PEAF CCGGTACTTCAAGCTAATCC	904	Park <i>i sar.</i> (2006)
		PEAR CCTTACCTATCGCTTCTCCT		
		BIP (B1 TCCCCACAGTGTACCAAGTTG+T linker+B2 TCGGCAGCCTATTCTCTG)	varijabilno	Li <i>i sar.</i> (2011)
		FIP (F1c GTCGCAGCCTCCGTTGAAGA+T linker+F2c AGCAAGCCTACCATCCCA)		
		B3 GCATTCTGTAGGCGAAGCG		
		F3 TGCTGTTGATAGCGGAAT		
		LoopF1 GTTACGCCGTTACTCAAAGA		
		LoopB1 GCGTCCTCTTGGCTTAAATA		
Pcb	Konvencionalna	BR1f GCGTGCCGGGTTTATGACCT	322	Duarte <i>i sar.</i> , (2004)
		L1r CA(A/G)GGCATCCACCGT		
		ExpecF GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA	550, 400	Kang <i>i sar.</i> (2003)
Pcc i Pwa	Konvencionalna (nested)	ExpecR GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG		
		INPCCF GGCCAAGCAGTGCCTGTATATCC		
		INPCCR TTCGATCACGCAACCTGCATTACT		
Pwa	Konvencionalna	Contig 1F CCTGCTGGCGTGGGGTATCG	258, 132	de Haan <i>i sar.</i> (2008)
		Contig 1R TTGCGGAAGATGTCGTGAGTGCG		
		Contig 3F GCATTGACCAGTTTCGCCAGTTAC		
	Real time PCR, TaqMan	Contig 3R CTTTTTGAGCAGCGGGGTTGTG	140	Kim <i>i sar.</i> (2011)
		PW7011F CTATGACGCTCGCGGGTGTGTT PW7011R CGGCGGCGTCGTAGTGGAAGTC		

Pba, <i>Dickeya</i> spp.	Konvencionalna, multipleks	ERWFOR ACGCATGAAATCGGCCATGC	389	Smid i sar. (1995)
		ATROREV ATCGATAATTGATTGTCCT		
		CHRREV AGTGCTGCCGTACAGCACGT		
	Multipleks PCR	Y45 TCACCGGACGCCGAAGTGTGGCGT	420, 600	Diallo i sar. (2009)
		Y46 TCGCCAACGTTTCAGCAGAACAAAGT		
		Ech1 TGGCGCGTCAGGAAGTTTAT		
		Ech1' TCACCGGTCAGGGTGAAGTT		
		Pca for GATCGGCATCATAAAAAACAG		
	Multipleks PCR	Pca rev CGCACACTTCATCCAGCGAG	690, 420	Peters i sar. (2007)
		Dcd Forw GAAAGCCCGCAGCCAGATC		
		Dcd Rev TCAGGATGGTTTTGTCATGC		

- podatak nije prisutan u publikacijiama

- podatak nije prisutan u publikacijama

Zahvalnica

Rad je rezultat aktivnosti koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, na osnovu ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada u 2020. godini.

LITERATURA

- Baghaee-Ravari, S., Rahimian H., Shams-Bakhsh, M., Lopez-Solanilla, E., Antunez-Lamas, M., Rodriguez-Palenzuela, P. (2011): Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 413–425.
- Burkholder, W.H. (1957): Genus VI. *Erwinia* Winslow et al. 1957. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th edn, pp. 349–359. Eds R.S. Breed, E.G.D. Murray and N.R. Smith. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Cahill, G., Fraser, K., Kowalewska M.J., Kenyon, D.M., Saddler, G.S. (2010): Recent findings from the Dickeya survey and monitoring programme. In: *Proceedings Crop Protection in Northern Britain 2010*, Dundee, UK, 171–6.
- Cazelles, O., Schwarzel, R., (1992): Survey of bacterial diseases caused by *Erwinia* in seed potato fields in western Switzerland. *Revue Suisse d'Agriculture* 24, 215–8.
- Czajkowski, A.O. (2006): The soft rot *Erwinia*. In: Gnanamanickam SS, ed. *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht, Netherlands: Springer, 423–505.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van Beckhoven, J., Sledz, W. (2014): Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: A review. *Annals of Applied Biology*. 166. 10.1111/aab.12166.
- Cuppels, D. A., Louws, F. J., Ainsworth, T. (2006): Development and evaluations of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Disease*, 90: 451 – 458.
- Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y. (1994): PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1437–1443.
- Diallo S., Latour X., Groboillot A., Smadja B., Copin P., Orange N., Feuilloley M.G.J., Chevalier S. (2009): Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *European Journal of Plant Pathology*, 125, 349–354.
- De Boer S.H., Copeman R.J., Vrugink H. (1979): Serogroups of *Erwinia carotovora* potato strains determined with diffusible somatic antigens. *Phytopathology*, 69, 316–319.
- De Boer S.H., Ward L.J. (1995): PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*, 85, 854–858.
- De Haan E.G., Dekker-Nooren T.C.E.M., van den Bovenkamp G.W., Speksnijder A.G.C.L., van der Zouwen P.S., van der Wolf J.M. (2008): *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 561–569.

- De Werra, P., Bussereau, F., Keiser, A., & Ziegler, D. (2015): First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Switzerland. *Plant Disease*, 99 (4), 551.
- Duarte V., de Boer S.H., Ward L.J., Oliveira A.M.R.D., (2004): Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 96: 535–545.
- Fréchon D., Exbrayat P., Helias V., Hyman L.J., Jouan B., Llop P., Lopez M.M., Payet N., Perombelon M.C.M., Toth I.K., van Backhoven J.R.C.M., van der Wolf J.M., Bertheau Y. (1998): Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Research*, 41, 163–173.
- FAO, 2019. FAOSTAT, Production 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Gardan L., Gouy C., Christen R., Samson R. (2003): Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 381–391.
- Golanowska, M. and Lojkowska, E. (2016): A review on *Dickeya solani*, a new pathogenic bacterium causing loss in potato yield in Europe. *BioTechnologia*. 2. 109–127. 10.5114/bta.2016.60781.
- Grahovac M., Grahovac J., Ignjatov M., Vlajkov V., Pajčin I., Dodić J., Loc M. (2019): Effects of cultivation conditions on *Bacillus amyloliquefaciens* activity against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. Book of abstracts, 4th International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases, Viterbo, Italy. *J Plant Pathol*, Issue 4, Vol. 101: 849. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00395-3>.
- He'lias V, (2006): Potato blackleg in France: incidence of causal *Erwinia* species and field symptoms expression. In: 1st International *Erwinia* Workshop, 7–9 July 2006, Dundee, Scotland, 15.
- Kang H.W., Kwon S.W., Go S.J. (2003): PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology*, 52, 127–133.
- Kim M.H., Cho M.S., Kim B.K., Choi H.J., Hahn J.H., Kim C.K., Kang M.J. (2011): Quantitative real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pectobacterium wasabiae* using YD repeat protein gene-based primers. *Plant Disease*, 96, 253–257.
- Laurila J., Joutsjoki T., Ahola V., Hannukkala A., Pirhonen M. (2006): Characterisation of *erwinias* causing blackleg and soft rot in Finland by sequencing and virulence tests. In: Abstracts from the 8th Conference of the European Foundation for Plant Pathology and the British Society for Plant Pathology Presidential Meeting 2006, 13–17 August 2006, KVL, Frederiksberg, Denmark, 73.
- Laurila J., Hannukkala A., Nykyri J., Pasanen M., Helias V., Garlant L., Pirhonen M. (2010): Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 249–262.
- Lee Y.A., Chen K.P., Hsu Y.W. (2006): Characterization of *Erwinia chrysanthemi*, the soft-rot pathogen of whiteflowered calla lily, based on pathogenicity and PCR-RFLP and PFGE analyses. *Plant Pathology*, 55, 530–536.
- Li X., Nie J., Ward L.J., Nickerson J., De Boer S.H. (2011): Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and identification of *Pectobacterium atrosepticum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33, 447–457.

- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G., Foster, G.D. (2012): Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 614–629.
- Nassar A., Darrasse A., Lemattre M., Kotoujansky A., Dervin C., Vedel R., Bertheau Y. (1996): Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2228–2235.
- Palacio-Bielsa A., Cambra M.A., Lopez M.M. (2006): Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. *Annals of Applied Biology*, 148, 157–164.
- Park D.S., Shim J.K., Kim J.S., Kim B.Y., Kang M.J., Seol Y.J., Hahn J.H., Sherstha R., Lim C.K., Go S.J., Kim H.G. (2006): PCR-based sensitive and specific detection of *Pectobacterium atrosepticum* using primers based on Rhs family gene sequences. *Plant Pathology*, 55, 625–629.
- Parkinson N., Stead D., Bew J., Heeney J., Tsrer L., Elphinstone J., (2009): *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of recA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2388–93.
- Perombelon M.C.M., Van Der Wolf J.M. (2002): Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. *Scottish Crop Research Institute Annual Report* 10.
- Persson P, (1991): Soft Rot *Erwinia* Species Attacking Potatoes in Sweden. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, Plant Protection Reports and Dissertations no. 20.
- Peters J., Sledz W., Bergervoet J.H.W., Van Der Wolf J.M. (2007): An enrichment microsphere immunoassay for the detection of *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya dianthicola* in potato tuber extracts. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 97–107.
- Popović T., Marković S., Bijelić Ž., Ilić R., Jelušić A., Stanković S. (2018): *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* – novi patogen krompira u Srbiji. XV Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 26–30. novembar, Zbornik rezimea radova, 23.
- Pritchard L., Humphris S., Saddler G.S., Parkinson N.M., Bertrand V., Elphinstone J.G., Toth I.K. (2012): Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences. *Plant Pathology*, 62, 587–596.
- Samson R., Legendre J.B., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W., Gardan L. (2005): Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1415–1427.
- Ślawiak M., Łojkowska E., van der Wolf J.M., 2009a. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathology* 58, 794.

- Smid EJ, Jansen AHJ, Gorris LGM, 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. *Plant Pathology* 44, 1058–69.
- Toth I.K., Avrova A.O., Hyman L.J. (2001): Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S–23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4070–4076.
- Tsrör L., Erlich O., Lebiush S., Hazarovsku M., Zig U., Slawiak M., Grabe G., van der Wolf J.M., van der Haar J.J. (2009): Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 311–320.
- van der Wolf J.M., Kastelein P., Van Beckhoven J.R.C.M., Van Den Brink M., De Vries P.M. (1996b): Verification of immunofluorescence colony-staining of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by reisolation and immunodiffusion or PCR. *EPPO Bulletin*, 26, 707–715.
- vander Wolf J., Czajkowski R., Velvis H. (2009): Effectieve kolonisatie van aardappelplanten door *Dickeya* soorten (*Erwinia chrysanthemi*). *Gewasbescherming Jaargang* 4, 169–71.
- van Vaerenbergh, J., Baeyen, S., De Vos, P., and Maes, M. (2012): Sequence diversity in the *Dickeya* flhC gene: phylogeny of the *Dickeya* genus and TaqMan (R) PCR for ‘*D. solani*’, new biovar 3 variant on potato in Europe. *PLoS One* 7:e35738-e35738
- Voronina M., Kabanova A., Shneider M., Korzhenkov A., Toshchakov S., Miroshnikov, K., Ignatov, A. (2018): First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Blackleg and Stem Rot Disease of Potato in Russia. *Plant Disease*. 103. 10.1094/PDIS-03-18-0456-PDN.
- Waleron M, Waleron K., and Lojkowska E. (2015): First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on potato and other vegetables in Poland. *Plant Disease*, 99 (9), 1271–1271.
- Zhao Y., & Dou J., Geng G., Tian Y., Fan J., Li X., Hu B. (2018): First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Blackleg and Stem Rot on Potato in China. *Plant Disease*. 102. 10.1094/PDIS-11-17-1779-PDN.

Abstract

***Pectobacterium* AND *Dickeya* SPECIES CAUSING POTATO BLACKLEG AND TUBER SOFT ROT**

**Marta Loc¹, Gordana Petrović², Maja Ignjatov², Dragana Budakov¹,
Mladen Petreš¹, Vera Stojšin¹, Mila Grahovac¹**

¹University of Novi Sad, Faculty of Agriculture

²Institute of Field and Vegetable Crops

E-mail: marta.loc@polj.uns.ac.rs

World potato production is affected by plant pathogenic bacteria, which significantly limit crop yield and quality in recent years. Bacteria belonging to *Pectobacterium* and *Dickeya* genera, causal agents of blackleg and tuber soft rot of potato, are considered as one of the most important pathogens that affect plant production worldwide. Main source of infection are latently infected seed tubers, which transmitted over long trade distances significantly increase disease incidence. Main identification tools for *Pectobacterium* and *Dickeya* species until recently were morphological and biochemical characterization methods, followed by pathogenicity tests. Due to phylogenetic heterogeneity of the soft rot and blackleg causing bacteria, identification and differentiation to species and subspecies level became increasingly difficult. Therefore, development of efficient and reliable identification methods is of high importance. Molecular and serological methods offer accurate, reliable and cost-effective differentiation of high specificity and reproducibility. This work aimed to review *Pectobacterium* i *Dickeya* species occurring on potato, with special highlight on available molecular identification techniques.

Key words: bacterial diseases of potato, soft rot, *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp., identification